

University of Groningen

The versatile activity of glycogen branching enzymes

Gänssle, Lucie

DOI:
[10.33612/diss.134377482](https://doi.org/10.33612/diss.134377482)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Gänssle, L. (2020). *The versatile activity of glycogen branching enzymes*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.134377482>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

De meeste organismen slaan koolhydraten als energiebron op in de vorm van zetmeel (in planten) of glycogeen (in bacteriën en dieren). Zetmeel en glycogeen bestaan uit α -D-anhydroglucose monomeren, gekoppeld door twee type glycoside bindingen. De meerderheid van de anhydroglucose monomeren is verbonden door α -1,4-bindingen, resulterend in een lineaire keten. Een klein deel is verbonden door α -1,6-bindingen, welke zorgen voor vertakkingen in het polymeer. Deze vertakkingen kunnen variëren in lengte, aantal en positie in het polymeer. Glycogeen heeft een grote hoeveelheid willekeurig verdeelde vertakkingen, waardoor het een typische globulaire vorm krijgt. Zetmeel bestaat uit twee type polymeren; het vrijwel onvertakt, langketige amylose en het vertakt amylopectine, dat qua opbouw op glycogeen lijkt. De clusters van vertakkingen in amylopectine hebben een polymerisatiegraad (PG) van ongeveer 18 anhydroglucose monomeren.

De synthese van vertakkingen wordt in de Natuur gekatalyseerd door vertakkingsenzymen (EC 2.4.1.18). Deze enzymen introduceren nieuwe vertakkingen door eerst een α -1,4-glycoside binding te verbreken, waarna een oligosacharide fragment naar een nieuwe keten wordt verplaatst en een vertakking in de vorm van een α -1,6-binding wordt gevormd. Naast deze vertakkingsactiviteit hebben GVEs ook nog een hydrolytische en een cyclisatie activiteit. Glycogeen-vertakkingsenzymen (GVEs), zoals die in de Natuur in micro-organismen en dieren voorkomen, zijn van nature actief op glycogeen. In de voedingsmiddelenindustrie worden GVEs gebruikt om hoog vertakte zetmeel structuren te produceren, welke een hoge vertakkingsdichtheid hebben en langzamer verteren. GVEs zijn nauw verwant aan zetmeelvertakkingsenzymen zoals die in planten voorkomen. Ze zijn onderverdeeld in de twee glycoside hydrolase (GH) families, GH13 en GH57. Het onderzoek aan GVEs is een uitdaging omdat voor een goede karakterisering van deze enzymen, die normaal actief zijn op complexe structuren, in het laboratorium substraten met tien of meer anhydroglucose eenheden ($PG \geq 10$) nodig zijn. Dergelijke substraten zijn niet eenvoudig te maken. Daarom wordt vaak zetmeel of amylose gebruikt als substraat. Amylose heeft het voordeel dat het lang-ketig en vrijwel lineair is. Elke nieuwe vertakking en korte keten in het product gemaakt uit amylose is een direct resultaat van de GVE-activiteit. Echter, amylose is te groot om met gangbare methoden zoals size-exclusion chromatografie (SEC) en high-performance anion exchange chromatografie (HPAEC) te analyseren. Daarbij komt ook nog de uitdaging dat GVE-activiteit

zich niet beperkt tot één enkele ketenlengte, van zowel het substraat als de gevormde vertakkingen. Hierdoor is het gevormde product even complex als het substraat.

De structurele complexiteit van zowel substraten als producten hindert de bepaling van GVE-activiteit. Een van de snelste methodes om GVE-activiteit te detecteren is met een jodiumtest, welke toepasbaar is tijdens bijvoorbeeld enzymzuivering. Deze methode is gebaseerd op een intens gekleurd complex tussen jodium en lange, lineaire anhydroglucose ketens. De intensiteit van het gevormde jodium-glucaan complex en de tint veranderen als gevolg van GVE-activiteit. In **hoofdstuk 2** is deze jodium kleuringsmethode geoptimaliseerd voor wat betreft de snelheid van de meting en de nauwkeurigheid door het werken met microtiter platen in plaats van reactievaatjes en het introduceren van metingen in de tijd. Op basis van de resultaten van een groot aantal experimenten is een wiskundige factor ontwikkeld welke dient als objectief criterium om enzymatische activiteit te kunnen onderscheiden van niet enzymatische, achtergrond activiteit.

Zetmeel van verschillende botanische bronnen varieert in type kristalstructuur, amylose gehalte en ketenlengte verdeling. Kennis van zetmeelstructuren draagt bij tot het begrijpen van de vertering van zetmeel in het menselijk lichaam. Het aantal studies dat uitgebreid verschillende soorten zetmeel vergelijkt op structurele eigenschappen is beperkt. **Hoofdstuk 3** beschrijft daarom de karakterisering van acht verschillende soorten zetmeel van diverse botanische oorsprong, inclusief mais, aardappel, erwt en tulp. Verschillende soorten zetmeel met eenzelfde kristaltype bleken een vergelijkbare fijn structuur te hebben. De snelheid van enzymatische vertering was niet alleen gelijk voor verschillende soorten zetmeel met een dezelfde kristaltypen, maar liet ook een correlatie zien tussen verteerbaarheid en vertakkingsgraad.

GVEs blijken substantieel te verschillen in de mate van activiteit, zowel in vergelijking met elkaar als op verschillende substraten. Omdat de meeste studies aan GVEs vaak een enkel substraat of een enkel enzym beschrijven, is er een onvolledig beeld van het mechanisme van GVEs. Er zijn geen algemene eigenschappen beschreven die mogelijk van invloed kunnen zijn op de structuur van het product. In **Hoofdstuk 4** wordt de activiteit van vijf GVEs (van zowel GH13 als GH57) op vier soorten zetmeel en een maltodextrine mix vergeleken. Analyse van het molecuulgewicht van de gevormde producten liet

een duidelijk verschil in grootte zien tussen de producten gemaakt met enzymen van de twee GH families. De ketenlengteverdeling heeft een specifiek patroon voor elk enzym. Daarnaast bleek de structuur van het substraat slechts een geringe invloed te hebben op de structuur van de gevormde producten. De meest duidelijke correlatie werd gevonden tussen het amylose gehalte en de molecuulgrootte en het aantal ketens in het product. Ook bleek er een correlatie te zijn tussen het type GVE en de vertakingsgraad en de ketenlengteverdeling van het product.

In **Hoofdstuk 5** zijn drie GH13 GVEs gebruikt voor modificatie van zeer zuiver DP17-18. Een verrassend resultaat is dat alle drie deze GVEs α -1,4-transferase activiteit vertoonden, wat resulteerde in verlenging van lineaire ketens. Deze transferase activiteit gebeurde naast de synthese van nieuwe vertakkingen, en leidde in eerste instantie tot het ontstaan van lineaire ketens die langer waren dan het substraat zelf. Na verloop van tijd werden de verlengde ketens gebruikt als substraat om nieuwe vertakkingen te maken. De drie bestudeerde GVEs hebben een behoorlijke variatie in zowel de voorkeur voor de specifieke lengte van de verplaatste ketens alsook in de snelheid waarmee deze ketens werden verplaatst. Resultaten van de modificatie van amylose suggereren dat de transferase activiteit van GVEs ook gebruikt wordt op complexe substraten zoals zetmeel.

Samenvattend heeft dit proefschrift de kennis van het werkingsmechanisme van GVE vergroot door belangrijke structurele eigenschappen van substraten en producten van GVEs te bestuderen. De belangrijkste conclusie is dat de microbiële bron van het GVE van groter belang is voor de structuur van het product dan het type substraat. Met andere woorden het maakt niet uit welk type zetmeel gebruikt wordt. Het type GVE bepaalt uiteindelijk de structuur van het vertakte product. Dit wordt vrijwel zeker veroorzaakt door de α -1,4-transferase activiteit oftewel de keten-verlengende activiteit welke alle drie de onderzochte GH13 GVEs bezitten. GVEs blijken veelzijdige enzymen te zijn die de mate waarin ze verschillende activiteiten gebruiken afstemmen op het beschikbare substraat.